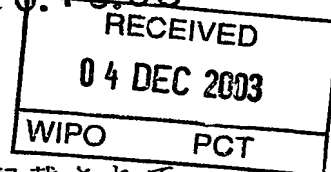


2005

PCT/JP03/13258

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

16.10.03



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日                      2 0 0 2 年 1 0 月 1 6 日  
Date of Application:

出 願 番 号                      特 願 2 0 0 2 - 3 0 1 3 2 7  
Application Number:  
[ST. 10/C]:                      [ J P 2 0 0 2 - 3 0 1 3 2 7 ]

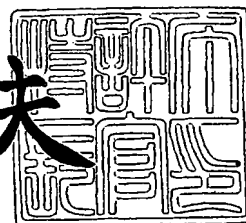
出      願      人                      協和メデックス株式会社  
Applicant(s):

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年 1 1 月 2 0 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号    出証特 2 0 0 3 - 3 0 9 5 8 7 2

【書類名】 特許願  
【整理番号】 H14-083MQ5  
【提出日】 平成14年10月16日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C12Q 1/00  
C12Q 1/26  
C12Q 1/60

## 【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町南一式字上山地 6 0 0 番 1 協和メ  
デックス株式会社 協和メデックス研究所内

【氏名】 片山 有基

## 【発明者】

【住所又は居所】 静岡県駿東郡長泉町南一式字上山地 6 0 0 番 1 協和メ  
デックス株式会社 協和メデックス研究所内

【氏名】 梅原 真由美

## 【特許出願人】

【識別番号】 000162478  
【氏名又は名称】 協和メデックス株式会社  
【代表者】 所 洋

## 【代理人】

【識別番号】 100106574  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 岩橋 和幸

## 【手数料の表示】

【予納台帳番号】 008408  
【納付金額】 21,000円

## 【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9505337

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検体と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミンを含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法。

【請求項2】 水性媒体が、胆汁酸類を含有する請求項1記載の方法。

【請求項3】 胆汁酸類が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、およびデヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸類である請求項2記載の方法。

【請求項4】 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンである請求項1～3のいずれかに記載の方法。

【請求項5】 ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

【請求項7】 非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

【請求項 8】 さらに、還元型補酵素を含有する請求項 7 記載の試薬。

【請求項 9】 さらに、胆汁酸類を含有する請求項 7 または 8 記載の試薬。

【請求項 10】 胆汁酸類が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、およびデヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸類である請求項 9 記載の試薬。

【請求項 11】 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンである請求項 6 ~ 10 のいずれかに記載の試薬。

【請求項 12】 ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である請求項 6 ~ 11 のいずれかに記載の試薬。

【請求項 13】 コレステロールエステル加水分解酵素およびポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

【請求項 14】 ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

【請求項 15】 コレステロールエステル加水分解酵素およびポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

【請求項 16】 ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

【請求項 17】 さらに、還元型補酵素測定用試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する請求項 15 または 16 記載のキット。

【請求項 18】 さらに、胆汁酸類を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する請求項 13～17 のいずれかに記載のキット。

【請求項 19】 胆汁酸類が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、および、デヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸類である請求項 18 記載のキット。

【請求項 20】 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンである請求項 13～19 のいずれかに記載のキット。

【請求項 21】 ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である請求項 13～20 のいずれかに記載のキット。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【0001】

##### 【発明の属する技術分野】

本発明は、検体中の高密度リポ蛋白 (HDL) 中のコレステロールの測定方法、測定用試薬および測定用キットに関する。

##### 【0002】

##### 【従来の技術】

生体中リポ蛋白は、その比重により高密度リポ蛋白（HDL）、低密度リポ蛋白（LDL）、超低密度リポ蛋白（VLDL）、カイロミクロン（CM）に分類されており、それぞれ主にアポ蛋白の種類の違いによって生体中での働きが大きく異なっており、脂質組成もさまざまである。その中で、HDLは、動脈壁を含めた各組織からコレステロールを受け取るために細胞内に蓄積したコレステロールの除去作用に関係し、冠動脈硬化症をはじめとする各種動脈硬化症の危険予防因子であり、その血中レベルは動脈硬化性疾患の発症予知の有用な指針となることが知られている。

### 【0003】

従来のHDL中のコレステロール（以下、HDLコレステロールと略記する）の測定法は、超遠心法、免疫化学的方法、電気泳動法、沈殿法等による分画操作とコレステロール定量操作の2段階からなる。しかしながら、分画操作は、操作が煩雑であり、長時間を要するものであり、また、安全性の点でも問題があった。従って、これらの分離操作を伴う測定法は極めて効率が悪く、実用化に適さない方法であった。

### 【0004】

近年、上記の問題を解決するために、種々の測定法が報告されている。例えば、血清または血漿を、コレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、および、胆汁酸塩または胆汁酸誘導体またはジオクチルスルホサクシネートを含む緩衝液中で当該酵素と反応させ、VLDLおよびLDL中のコレステロールをHDLコレステロールに先駆けて反応させ、生成した過酸化水素を測定した後、非イオン系のポリオキシエチレンオキシド基含有界面活性剤を反応液に添加し、HDLコレステロールと当該酵素とを反応させ、HDLコレステロールを特異的に分別定量する方法（特許文献1参照）、血清を、特定のpHおよび特定の温度の下、膵臓由来のコレステロールエステラーゼ、コレステロールオキシダーゼ、胆汁酸群の界面活性剤、および、非イオン系界面活性剤を含む緩衝液中で当該酵素と反応させることによりHDLコレステロールを測定する方法（特許文献2参照）が知られている。特許文献2に記載の測定法では、まず、LDLコレステロールと当該酵素との反応が進行し、次いで、HDLコレステロール

と当該酵素との反応が進行し、HDLコレステロールの測定が可能となる。しかしながら、これらの測定法は、測定に長時間を要し、また、必ずしも、HDLコレステロールに特異的な測定法ではなかった。

#### 【0005】

HDL以外のリポ蛋白を凝集させてHDLコレステロールを測定する方法としては、例えばデキストラン硫酸等のHDL以外のリポ蛋白を凝集させる試薬、2価の金属塩、および、化学的に修飾された酵素を用いる測定法（特許文献3参照）、ポリアニオン等のHDL以外のリポ蛋白と複合体を形成する試薬と、ポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物等のリポ蛋白を溶解しない界面活性剤とを用いる測定法（特許文献4参照）、デキストラン硫酸等のポリアニオン、2価の金属塩、特定の非イオン性界面活性剤および試料由来のアルブミンとは別異のアルブミンとを用いる測定法（特許文献5参照）、血清または血漿を、リポ蛋白分画剤（デキストラン硫酸等のポリアニオンとマグネシウムイオン等の2価陽イオンとの組み合わせ）を含む溶液で処理し、得られた混合液を固体および液体の分離処理することなく、アニオン性界面活性剤（アルキルスルホン酸または胆汁酸もしくはその誘導体）の存在下に、コレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼと反応させ、生成した過酸化水素を測定することを特徴とする血清または血漿中のHDLコレステロールを測定する方法（特許文献6参照）等が知られている。

#### 【0006】

しかしながら、これらのHDL以外のリポ蛋白を凝集させるHDLコレステロール測定法においては、従来の基準法と良好な相関性があるものの、反応で生成する凝集物による濁りに起因する不正確性、反応セルのアルカリ洗浄の際に、反応液中の金属塩との反応で生成する金属水酸化物の析出による自動分析装置への過度の負荷等の問題がある。

#### 【0007】

HDL以外のリポ蛋白を凝集させずにHDLコレステロールを測定する方法としては、例えば生体試料に、ポリアニオン等のHDL以外のリポ蛋白質と複合体を形成する物質と、リポ蛋白質を溶解しない特定の界面活性剤とを添加した後、



酵素的にHDLコレステロールを測定する方法（特許文献7参照）、生体試料と、膵臓由来のコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼとを、胆汁酸もしくはその塩およびアルブミン存在下に反応させ、当該酵素反応により消費または生成する化合物を測定することによる生体試料中のHDLコレステロールの測定方法（特許文献8参照）、HDL画分に対して反応選択性をもつHLB値が16以上の非イオン性界面活性剤の存在下に、検体と、HDL画分に優先的に作用するリポプロテインリパーゼおよび／またはコレステロールエステラーゼならびにコレステロール酸化酵素とを反応させて、検体中のHDLコレステロールを測定する方法（特許文献9参照）等が知られている。また、アシルポリオキシエチレンソルビタンエステルによりHDL以外のリポ蛋白中のコレステロールを優先的に過酸化水素へ変換し、生成した過酸化水素を消去した後、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの添加により、HDLコレステロールを酵素的に測定する方法（特許文献10参照）も知られている。

#### 【0008】

しかしながら、これらのHDL以外のリポ蛋白を凝集させないHDLコレステロールの測定法においては、HDL以外のリポ蛋白中コレステロールの不完全な消去や、HDL以外のリポ蛋白中のコレステロールに対する非特異反応に起因する測定値の不正確性が問題となる場合がある。

また、光学的手法により検体中の特定物質の測定を行う場合、M蛋白血症や骨髓腫等の患者由来の検体では、水不溶性の蛋白に起因する濁りが光学的な影響を与えることが大きな問題となっている。この光学的な影響を回避するために、反応液中の塩類を高濃度とし、水不溶性蛋白に起因する濁りを解消させる方法が一般的に知られている。しかしながら、HDLコレステロールの測定においては、高濃度の塩類を存在させることにより、HDLコレステロールに対する特異性の低下や、さらには含有されている酵素の失活を招く場合があることから、高濃度の塩類の存在下でのHDLコレステロールの測定は、極めて困難である場合が多い。

#### 【0009】

#### 【特許文献1】

特開昭 62-69999 号公報

【0010】

【特許文献 2】

特開昭 63-126498 号公報

【0011】

【特許文献 3】

特開平 8-131197 号公報

【0012】

【特許文献 4】

特開平 8-201393 号公報

【0013】

【特許文献 5】

特開平 9-285298 号公報

【0014】

【特許文献 6】

特開平 8-116996 号公報

【0015】

【特許文献 7】

特開平 8-131197 号公報

【0016】

【特許文献 8】

国際公開第 97/40376 号パンフレット

【0017】

【特許文献 9】

国際公開第 00/52480 号パンフレット

【0018】

【特許文献 10】

特開平 9-299 号公報

【0019】

**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の目的は、簡便で、かつ、M蛋白血症や骨髓腫等の患者に由来する検体のような特殊な検体でも正確な測定ができるHDLコレステロールの測定方法、測定用試薬および測定用キットを提供することにある。

**【0020】****【課題を解決するための手段】**

本発明は、下記〔1〕～〔21〕に関する。

〔1〕 検体と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミンを含有する水性媒体中で反応させ、生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法。

〔2〕 水性媒体が、さらに、胆汁酸類を含有する〔1〕記載の方法。

〔3〕 胆汁酸類が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、およびデヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸類である〔2〕記載の方法。

〔4〕 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンである〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の方法。

〔5〕 ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である〔1〕～〔4〕のいずれかに記載の方法。

**【0021】**

〔6〕 非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を

含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

[7] 非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用試薬。

[8] さらに、還元型補酵素を含有する [7] 記載の試薬。

[9] さらに、胆汁酸類を含有する [6] ~ [8] のいずれかに記載の試薬

。

[10] 胆汁酸類が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、およびデヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸類である [9] 記載の試薬。

[11] 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンである [6] ~ [10] のいずれかに記載の試薬。

[12] ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である [6] ~ [11] のいずれかに記載の試薬。

#### 【0022】

[13] コレステロールエステル加水分解酵素およびポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

[14] ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素を含有する第二試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび過酸化水素測定試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステ

ロール測定用キット。

[15] コレステロールエステル加水分解酵素およびポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

[16] ポリアニオンを含有する第一試薬と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール脱水素酵素を含有する第二試薬とを含有し、非イオン性界面活性剤、アルブミンおよび酸化型補酵素を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有することを特徴とする高密度リポ蛋白中のコレステロール測定用キット。

#### 【0023】

[17] さらに、還元型補酵素測定用試薬を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する [15] または [16] に記載のキット。

[18] さらに、胆汁酸類を、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有する [13] ~ [17] のいずれかに記載のキット。

[19] 胆汁酸類が、コール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、および、デヒドロコール酸もしくはその塩からなる群より選ばれる胆汁酸類である [18] 記載のキット。

[20] 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルアミンである [13] ~ [19] のいずれかに記載のキット。

[21] ポリアニオンが、デキストラン硫酸またはその塩である [13] ~ [20] のいずれかに記載のキット。

#### 【0024】

**【発明の実施の形態】**

本発明のHDLコレステロールの測定方法は、HDL以外のリポ蛋白中のコレステロールを消去することなく、HDLコレステロールを測定する方法である。

本発明の測定方法において用いられる検体としては、例えば全血、血漿、血清、髄液、唾液、羊水、尿、汗、腓液等が挙げられるが、血漿および血清が好ましい。

**【0025】**

本発明におけるコレステロールエステル加水分解酵素としては、コレステロールエステルを加水分解する能力を有する酵素であれば特に限定はなく、例えば動物、植物または微生物由来のコレステロールエステラーゼ、リポプロテインリパーゼの他、遺伝子工学的な手法により製造されるコレステロールエステラーゼ、リポプロテインリパーゼ等も用いることができる。

**【0026】**

コレステロールエステル加水分解酵素としては、無修飾のコレステロールエステル加水分解酵素も、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素も使用することができる。また、コレステロールエステル加水分解酵素としては市販品を使用することもできる。

市販されているコレステロールエステル加水分解酵素としては、コレステロールエステラーゼ“Amano”2（CHE2；天野エンザイム社製）、コレステロールエステラーゼ“Amano”3（CHE3；天野エンザイム社製）、リポプロテインリパーゼ（LPL311；東洋紡製社製）、リポプロテインリパーゼ“Amano”6（LPL6；天野エンザイム社製）、コレステロールエステラーゼ[C OE 313（化学的に修飾されたコレステロールエステラーゼ）；東洋紡績社製]等が挙げられる。また、本発明においては、2種類以上のコレステロールエステル加水分解酵素を組み合わせ用いることもできる。

**【0027】**

コレステロールエステル加水分解酵素の化学修飾において当該酵素を修飾する基（化学修飾基）としては、例えばポリエチレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールを主成分とする基、ポリプロピレングリコールとポリ

エチレングリコールの共重合体を有する基、水溶性多糖類を含有する基、スルホプロピル基、スルホブチル基、ポリウレタン基、キレート機能を有する基等が挙げられるが、ポリエチレングリコールを主成分とする基が好ましい。水溶性多糖類としては、例えばデキストラン、プルラン、可溶性デンプン等が挙げられる。

#### 【0028】

コレステロールエステル加水分解酵素を化学的に修飾するための試薬（化学修飾剤）としては、上記の化学修飾基と、酵素のアミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基等と反応し得る官能基または構造とを併せ持つ化合物等が挙げられる。酵素中のアミノ基と反応し得る官能基または構造としては、例えばカルボキシル基、活性エステル基（N-ヒドロキシサクシンイミド基等）、酸無水物、酸塩化物、アルデヒド、エポキシド基、1, 3-プロパンスルトン、1, 4-ブタンスルトン等が挙げられる。酵素中のカルボキシル基と反応し得る官能基または構造としては、例えばアミノ基等が挙げられる。酵素中のスルフヒドリル基と反応性がある基または構造としては、例えばマレイミド基、ジスルフィド、 $\alpha$ -ハロエステル（ $\alpha$ -ヨードエステル等）等が挙げられる。

#### 【0029】

化学修飾剤として、市販品を使用することもできる。市販されている化学修飾剤としては、ポリエチレングリコールを主成分とする基とN-ヒドロキシサクシンイミド基とを有するサンブライトVFM-4101、サンブライトMEAC-50HS、サンブライトMEC-50HS（いずれも日本油脂社製）、ポリアルキレングリコールを主成分とする基と酸無水物構造とを有するサンブライトAKMシリーズ（例えば、サンブライトAKM-1510等）、サンブライトADMシリーズ、サンブライトACMシリーズ（いずれも日本油脂社製）、ポリエチレングリコールを主成分とする基とエポキシド基とを有するEPOX-3400、M-EPOX-5000（いずれもSheawater Polymers社製）、キレート機能を有する基と酸無水物構造とを有するジエチレントリアミン-N, N, N', N', N'-ペンタ無水酢酸（DTPA anhydride；同仁化学社製）等が挙げられる。

#### 【0030】

コレステロールエステル加水分解酵素の化学修飾は、例えば以下の方法で行うことができるが、本方法に限定されるものではない。まず、コレステロールエステル加水分解酵素を pH 8.0 以上の緩衝液（例えば HEPES 緩衝液）に溶解し、0～55℃で 0.01～500 倍モル量の化学修飾剤を添加し、5 分間～5 時間攪拌する。実際の酵素反応においては、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素として、この反応液そのもののみならず、必要に応じて限外濾過膜等により未反応の化学修飾剤等を除去したものも、使用することもできる。

### 【0031】

本反応の方法に用いられるコレステロールエステル加水分解酵素の濃度としては、本発明の HDL コレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中で 0.01～200 U/mL の濃度であることが好ましく、0.02～100 U/mL であることがより好ましい。

### 【0032】

本発明におけるコレステロール酸化酵素としては、コレステロールを酸化して過酸化水素を生成する能力を有する酵素であれば特に制限はなく、例えば動物、植物または微生物由来のコレステロールオキシダーゼの他、遺伝子工学的な手法により製造されるコレステロールオキシダーゼ等も用いることができ、コレステロールオキシダーゼ “Amano” 1 (CHOD 1; 天野エンザイム社製)、コレステロールオキシダーゼ (CO-PE; キッコーマン社製)、コレステロールオキシダーゼ (COO 321; 東洋紡績社製) 等の市販品を用いることもできる。また、本発明においては、2 種類以上のコレステロール酸化酵素を組み合わせ用いることもできる。

### 【0033】

コレステロール酸化酵素は、無修飾の酵素であっても、化学的に修飾された酵素であってもよい。化学的に修飾されたコレステロール酸化酵素は、例えば前述の化学修飾剤を用いて、前述の化学修飾方法により作製することができる。

本反応の方法に用いられるコレステロール酸化酵素の濃度としては、本発明の HDL コレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応



液中で 0.01~200 U/mL の濃度であることが好ましく、0.02~100 U/mL の濃度であることがより好ましい。

#### 【0034】

本発明におけるコレステロール脱水素酵素としては、酸化型補酵素の存在下にコレステロールを酸化して還元型補酵素を生成する能力を有する酵素であれば特に制限はなく、例えば動物、植物または微生物由来のコレステロールデヒドロゲナーゼの他、遺伝子工学的な手法により製造されるコレステロールデヒドロゲナーゼ等も用いることができる。コレステロールデヒドロゲナーゼ “Amano” 5 (CHDH5; 天野エンザイム社製) 等の市販品を用いることもできる。また、本発明においては、2種類以上のコレステロール脱水素酵素を組み合わせることもできる。コレステロール脱水素酵素は、無修飾の酵素であっても、化学的に修飾された酵素であってもよい。化学的に修飾されたコレステロール脱水素酵素は、例えば前述の化学修飾剤を用いて、前述の化学修飾方法により作製することができる。

#### 【0035】

本反応の方法に用いられるコレステロール脱水素酵素の濃度としては、本発明の HDL コレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中で 0.01~200 U/mL の濃度であることが好ましく、0.02~100 U/mL の濃度であることがより好ましい。

#### 【0036】

本発明のコレステロール脱水素酵素を用いた測定法においては、酸化型補酵素が使用される。酸化型補酵素としては、例えば NAD、NADP、thio-NAD、thio-NADP 等が挙げられる。

#### 【0037】

本発明において用いられる非イオン性界面活性剤としては、本発明の HDL コレステロールの測定を可能とする非イオン性界面活性剤であれば特に制限はなく、例えばポリオキシエチレンアルキルアミン、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンアリールエーテル誘導体、エチレンジアミンポリオキシエチレンーポリオキシプロピレン縮合物等が挙げられるが、ポリオキシエチレ

ンアルキルアミンが好ましい。ポリオキシエチレンアルキルアミンおよびポリオキシエチレンアルキルエーテルにおけるアルキルとしては、直鎖または分枝状の炭素数8～22の、例えばオクチル、イソオクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル（ラウリル）、トリデシル、テトラデシル（ミリスチル）、ペンタデシル、ヘキサデシル（セチル）、ヘプタデシル、オクタデシル（ステアリル）、ノナデシル、イコシル、ヘネイコシル、ドコシル（ベヘニル）等が挙げられる。ポリオキシエチレンアリアルエーテル誘導体におけるアリアルとしては、例えばフェニル、ナフチル等が挙げられる。ポリオキシエチレンアリアルエーテル誘導体としては、例えばポリオキシエチレンスチレン化フェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテルホルムアルデヒド縮合物等が挙げられる。また、本発明においては、非イオン性界面活性剤を2種類以上用いてもよい。本発明のHDLコレステロールの測定方法における非イオン性界面活性剤の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.0001～10%であることが好ましく、0.001～1%がより好ましい。

#### 【0038】

本発明において用いられるアルブミンとしては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とするアルブミンであれば特に限定はなく、例えばウシ、ウマ、ヒツジ、ヒト由来のアルブミン等が挙げられるが、ウシ血清アルブミン（BSA）が好ましい。また、遺伝子工学的な手法により製造されたアルブミンも用いることができる。本発明においては、2種類以上のアルブミンを組み合わせて使用することもできる。本発明のHDLコレステロールの測定におけるアルブミンの濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.001～10%であることが好ましく、0.01～1%がより好ましい。

#### 【0039】

本発明において用いられるポリアニオンとしては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とするポリアニオンであれば特に制限はなく、例えばデキスト

ラン硫酸もしくはその塩、ヘパリンもしくはその塩、リントングステン酸またはその塩、硫酸化シクロデキストリンまたはその塩、硫酸化オリゴ糖またはその塩等が挙げられるが、デキストラン硫酸もしくはその塩が好ましい。デキストラン硫酸としては、例えば分子量が4万、8万、20万、50万、100万、200万等のデキストラン硫酸が挙げられる。硫酸化オリゴ糖としては、例えば硫酸化アガロース、硫酸化トレハロース、コンドロイチン硫酸等が挙げられる。塩としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩、リチウム塩、アンモニウム塩、マグネシウム塩等が挙げられる。また、本発明においては、ポリアニオンを2種以上用いてもよい。本発明のHDLコレステロールの測定におけるポリアニオンの濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.001~10%であることが好ましく、0.01~1%がより好ましい。

#### 【0040】

本発明において用いられる胆汁酸類としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする胆汁酸類であれば特に制限はないが、例えばコール酸もしくはその塩、タウロコール酸もしくはその塩、グリココール酸もしくはその塩、リトコール酸もしくはその塩、デオキシコール酸もしくはその塩、ケノデオキシコール酸もしくはその塩、ウルソデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシリトコール酸もしくはその塩、12-オキシケノデオキシコール酸もしくはその塩、7-オキシデオキシコール酸もしくはその塩、ヒオコール酸もしくはその塩、ヒオデオキシコール酸もしくはその塩、デヒドロコール酸もしくはその塩等が挙げられる。塩としては、例えばアンモニウム塩、リチウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩、マグネシウム塩、カルシウム塩等が挙げられる。胆汁酸類の濃度としては、本発明のHDLコレステロールの測定を可能とする濃度であれば特に制限はないが、反応液中の濃度が0.001~10%であることが好ましく、0.01~1%がより好ましい。

#### 【0041】

本発明のHDLコレステロール測定方法において使用される水性媒体としては、例えば脱イオン水、蒸留水、緩衝液等が挙げられるが、緩衝液が好ましい。緩

衝液に用いる緩衝剤としては、例えばトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン緩衝剤、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、グッドの緩衝剤等が挙げられる。グッドの緩衝剤としては、例えば2-モルホリノエタンスルホン酸（MES）、ビス（2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタン（Bis-Tris）、N-（2-アセトアミド）イミノ二酢酸（ADA）、ピペラジン-N, N'-ビス（2-エタンスルホン酸）（PIPES）、N-（2-アセトアミド）-2-アミノエタンスルホン酸（ACES）、3-モルホリノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（MOPSO）、N, N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸（BES）、3-モルホリノプロパンスルホン酸（MOPS）、N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕-2-アミノエタンスルホン酸（TES）、2-〔4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル〕エタンスルホン酸（HEPES）、3-〔N, N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）アミノ〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（DIPSO）、N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕-2-ヒドロキシ-3-アミノプロパンスルホン酸（TAPSO）、ピペラジン-N, N'-ビス（2-ヒドロキシプロパンスルホン酸）（POPSO）、3-〔4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル〕-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（HEPPSO）、3-〔4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル〕プロパンスルホン酸〔（H）EPPS〕、N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕グリシン（Tricine）、N, N'-ビス（2-ヒドロキシエチル）グリシン（Bicine）、N-トリス（ヒドロキシメチル）メチル-3-アミノプロパンスルホン酸（TAPS）、N-シクロヘキシル-2-アミノエタンスルホン酸（CHES）、N-シクロヘキシル-3-アミノ-2-ヒドロキシプロパンスルホン酸（CAPSO）、N-シクロヘキシル-3-アミノプロパンスルホン酸（CAPS）等が挙げられる。緩衝液の濃度は測定に適した濃度であれば特に制限はされないが、0.001~2.0mol/Lが好ましく、0.005~1.0mol/Lがより好ましい。

#### 【0042】

以下に、本発明のHDLコレステロールの測定方法、測定用試薬および測定用

キットを具体的に説明する。

(HDLコレステロールの測定方法)

本発明のHDLコレステロールの測定方法としては、例えば以下の態様の方法が挙げられる。

#### 【0043】

##### 測定方法1

(1) 検体と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミンを含有する水性媒体中で反応させ、

(2) 生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、

(3) (2)で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

#### 【0044】

##### 測定方法2

(1) 検体と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、コレステロールエステル加水分解酵素、酸化型補酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミンおよび胆汁酸類を含有する水性媒体中で反応させ、

(2) 生成した過酸化水素または還元型補酵素を測定し、

(3) (2)で測定した値と、予め作成した検量線とから、検体中のHDLコレステロール濃度を算出することにより、検体中のHDLコレステロールを測定することができる。

#### 【0045】

本測定法においては、(1)の反応は、例えば10～50℃で、好ましくは20～40℃で、1～60分間、好ましくは2～30分間行う。

生成した過酸化水素の量は、例えば過酸化水素測定用試薬により測定することができる。過酸化水素測定用試薬は、生成した過酸化水素を検出可能な物質へ変

換するための試薬である。検出可能な物質としては、例えば色素、発光等が挙げられるが、色素が好ましい。検出可能な物質が色素の場合には、過酸化水素測定用試薬は、酸化発色型色原体およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質を含有する。酸化発色型色原体としては、例えば後述の酸化発色型色原体が挙げられる。検出可能な物質が発光の場合には、過酸化水素測定用試薬は、化学発光物質を含有する。化学発光物質としては、例えばルミノール、イソルミノール、ルシゲニン、アクリジニウムエステル等が挙げられる。

#### 【0046】

過酸化水素測定用試薬として、酸化発色型色原体およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質を含有する試薬を用いる場合には、過酸化水素は、過酸化活性物質の存在下に酸化発色型色原体と反応して色素を生成し、生成した色素を定量することにより、過酸化水素を定量することができる。また、化学発光物質を含有する過酸化水素測定用試薬を用いる場合には、過酸化水素は、化学発光物質と反応してフォトンを生じ、生じたフォトンを定量することにより、過酸化水素を定量することができる。

#### 【0047】

酸化発色型色原体としては、例えばロイコ型色原体、酸化カップリング発色型色原体等が挙げられる。ロイコ型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、単独で色素へ変換される物質である。具体的には、10-N-カルボキシメチルカルバモイル-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(CCAP)、10-N-メチルカルバモイル-3, 7-ビス(ジメチルアミノ)-10H-フェノチアジン(MCDP)、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム塩(DA-64)、4, 4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、ビス[3-ビス(4-クロロフェニル)メチル-4-ジメチルアミノフェニル]アミン(BCMA)等が挙げられる。

#### 【0048】

酸化カップリング発色型色原体は、過酸化水素およびペルオキシダーゼ等の過酸化活性物質の存在下、2つの化合物が酸化的カップリングして色素を生成する

物質である。2つの化合物の組み合わせとしては、カプラーとアニリン類との組み合わせ、カプラーとフェノール類との組み合わせ等が挙げられる。カプラーとしては、例えば4-アミノアンチピリン(4-AA)、3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラジン等が挙げられる。アニリン類としては、N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン(MAOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N, N-ジメチル-3-メチルアニリン、N, N-ジ(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-サクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-4-フルオロ-3, 5-ジメトキシアニリン(F-DAOS)等が挙げられる。フェノール類としては、フェノール、4-クロロフェノール、3-メチルフェノール、3-ヒドロキシ-2, 4, 6-トリヨード安息香酸(HTIB)等が挙げられる。

#### 【0049】

過酸化水素の測定において、過酸化活性物質の濃度は、測定に適した濃度であれば特に制限はないが、過酸化活性物質としてペルオキシダーゼを用いる場合は、1~100kU/Lが好ましい。また、酸化発色型色原体の濃度は、測定に適した濃度であれば特に制限はないが、0.01~10g/Lが好ましい。

## 【0050】

還元型補酵素の測定方法としては、例えば生成した還元型補酵素の吸光度を測定する方法、還元型補酵素測定用試薬を用いる方法等が挙げられる。還元型補酵素の吸光度を測定する方法における吸光度としては、300～500 nmが好ましく、330～400 nmがより好ましく、340 nm付近が特に好ましい。還元型補酵素測定用試薬は、生成した還元型補酵素を検出可能な物質へ変換するための試薬である。検出可能な物質としては、例えば色素等が挙げられる。検出可能な物質が色素の場合の還元型補酵素測定用試薬としては、例えばジアホラーゼ、電子キャリアーおよび還元発色型色原体を含有する試薬が挙げられる。電子キャリアーとしては、例えば1-メトキシ-5-メチルフェナジウムメチルサルフェート等が挙げられる。還元型補酵素測定用試薬として、ジアホラーゼ、電子キャリアーおよび還元発色型色原体を含有する試薬を用いる場合には、還元発色型色原体が変換されて生成した色素を定量することにより、還元型補酵素を定量することができる。

## 【0051】

還元発色型色原体としては、例えば3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム プロミド (MTT)、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム モノナトリウム塩 (WST-1)、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム モノナトリウム塩 (WST-3) 等が挙げられる。

## 【0052】

(HDLコレステロール測定用試薬)

本発明のHDLコレステロール測定用試薬としては、例えば以下の態様の試薬が挙げられる。

試薬1

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミンおよび過酸化水素測定用試薬を含有する



試薬。

#### 試薬 2

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸類および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

【0053】

#### 試薬 3

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミンおよび酸化型補酵素を含有する試薬。

#### 試薬 4

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸類および酸化型補酵素を含有する試薬。

#### 試薬 5

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### 試薬 6

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸類、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

【0054】

本発明のHDLコレステロール測定用試薬においては、前述の本発明のHDLコレステロールの測定方法において挙げられたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸類、過酸化水素測定用試薬、酸化型補酵素、還元型補酵素測定用試薬を用いることができる。

【0055】

(HDLコレステロール測定用キット)

本発明のHDLコレステロール測定用試薬は、キットの形態で保存、流通および使用されてもよい。キットの形態としては、特に制限はなく、2試薬系、3試薬系等のいずれであってもよいが、2試薬系が好ましい。

#### 【0056】

第一試薬と第二試薬とからなる2試薬系のHDLコレステロール測定用キットにおいては、コレステロールエステル加水分解酵素と、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素とは、第一試薬と第二試薬に別々に含有されても、第二試薬と一緒に含有されてもよいが、第一試薬と第二試薬に別々に含有される場合には、コレステロールエステル加水分解酵素が第一試薬に、コレステロール酸化酵素またはコレステロール脱水素酵素が第二試薬に含有される態様が好ましい。ポリアニオンは、第一試薬に含有されることが好ましい。非イオン性界面活性剤およびアルブミンは、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。コレステロール脱水素酵素を用いた測定法において使用される酸化型補酵素は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。過酸化水素測定用試薬は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよいが、当該試薬が酸化カップリング型色原体を含有する場合には、酸化カップリング型色原体のそれぞれの化合物は別々の試薬に含有される態様が好ましい。還元型補酵素測定用試薬は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。また、胆汁酸類は、第一試薬、第二試薬のいずれかまたは両方に含有されてもよい。

#### 【0057】

具体的には、例えば以下の態様のキットが挙げられる。

##### キット1

###### 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

###### 第二試薬

コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

##### キット2

**第一試薬**

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤、胆汁酸類および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

**第二試薬**

コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

【0058】

キット3**第一試薬**

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

**第二試薬**

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

キット4**第一試薬**

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

**第二試薬**

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、胆汁酸類および過酸化水素測定用試薬を含有する試薬。

【0059】

キット5**第一試薬**

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

**第二試薬**

コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

キット6**第一試薬**

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および胆汁酸類を含有する試薬。

#### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

【0060】

#### キット7

##### 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

#### キット8

##### 第一試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤および胆汁酸類を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

【0061】

#### キット9

##### 第一試薬

ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

##### 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素および酸化型補酵素を含有する試薬。

#### キット10

##### 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および胆汁酸類を含有する試薬。

## 【0062】

キット11

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミンおよび非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素および還元型補酵素測定用試薬を含有する試薬。

キット12

## 第一試薬

ポリアニオン、アルブミン、非イオン性界面活性剤を含有する試薬。

## 第二試薬

コレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール脱水素酵素、酸化型補酵素、還元型補酵素測定用試薬および胆汁酸類を含有する試薬。

## 【0063】

本発明のHDLコレステロール測定用キットにおいては、前述の本発明のHDLコレステロールの測定方法において挙げられたコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、コレステロール脱水素酵素、非イオン性界面活性剤、ポリアニオン、アルブミン、胆汁酸類、過酸化水素測定用試薬、酸化型補酵素、還元型補酵素測定用試薬を用いることができる。

## 【0064】

本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットには、必要に応じて、水性媒体、安定化剤、防腐剤、影響物質消去剤等が含有されてもよい。水性媒体としては、例えば前述の水性媒体等が挙げられる。安定化剤としては、例えばエチレンジアミン四酢酸(EDTA)等が挙げられる。防腐剤としては、例えばアジ化ナトリウム、抗生物質等が挙げられる。影響物質消去剤としては、例えばアスコルビン酸の影響を消去するためのアスコルビン酸オキシダーゼ等が挙

げられる。

#### 【0065】

本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットは、凍結乾燥された状態でも、水性媒体に溶解された状態でもよい。凍結乾燥された状態の試薬を用いて検体中のHDLコレステロールを測定する場合には、当該試薬は水性媒体に溶解して使用される。

#### 【0066】

本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおけるコレステロールエステル加水分解酵素、コレステロール酸化酵素、コレステロール脱水素酵素の含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.01~800 U/mLとなる含量が好ましく、0.02~400 U/mLとなる含量がより好ましい。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおける非イオン性界面活性剤の含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.0001~10%となる含量が好ましく、0.001~5%となる含量がより好ましい。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおけるポリアニオンの含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.001~10%となる含量が好ましく、0.01~5%となる含量がより好ましい。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおけるアルブミンの含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.001~10%となる含量が好ましく、0.01~5%となる含量がより好ましい。本発明のHDLコレステロール測定用試薬および測定用キットにおける胆汁酸類の含量としては、水性媒体で溶解された状態での濃度が0.001~10%となる含量が好ましく、0.01~5%となる含量がより好ましい。

#### 【0067】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を何ら限定するものではない。尚、本実施例においては、下記メーカーの試薬および酵素を使用した。

HEPES (BDH Laboratory社製)、EMSE (ダイトーケミックス社製)、デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万) (ファルマシア社

製)、ウシ血清アルブミン(BSA;オリエンタル社製)、4-アミノアンチピリン(埼京化成社製)、ペルオキシダーゼ(東洋紡績社製)、LPL311(コレステロールエステル加水分解酵素;東洋紡績社製)、COO321(コレステロールオキシダーゼ;東洋紡績社製)、LPL6(コレステロールエステル加水分解酵素;天野エンザイム社製)、ナイミーンL207(ポリオキシエチレンドデシルアミン;日本油脂社製)、コール酸ナトリウム(ACROS社製)。

## 【0068】

## 【実施例】

参考例1 化学修飾LPL311(化学的に修飾されたLPL311)の調製  
HEPES緩衝液(pH8.5, 0.15 mol/L)に、LPL311を33 g/Lとなるように加え5℃に冷却した後、サンブライトVFM-4101(日本油脂社製)を330 g/Lとなるよう加え、さらに3時間反応させた。得られた修飾酵素溶液を精製分離せずそのまま化学修飾LPL311として使用した。

## 【0069】

## 実施例1 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬(試薬A)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム(分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

## 第二試薬(試薬a)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

【0070】

## 実施例2 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬A)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬b)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

【0071】

## 実施例3 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬A)

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬c)

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
---------------	-----------



4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 【0072】

## 実施例4 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬（試薬A）

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量50万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L
ナイミーンL207	0.07 g/L

## 第二試薬（試薬d）

HEPES (pH7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
コール酸ナトリウム	6.0 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
化学修飾LPL311	0.2 kU/L
COO321	3.0 kU/L

## 【0073】

## 比較例1 HDLコレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなるHDLコレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬（試薬B）

HEPES (pH7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L

BSA

2.0 g/L

## 第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

LPL 6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

【0074】

## 比較例 2 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬 C)

HEPES (pH 7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

デキストラン硫酸ナトリウム (分子量 50 万)

1.0 g/L

## 第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

LPL 6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

【0075】

## 比較例 3 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬 D)

HEPES (pH 7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

ナイミーン L207

0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

【0076】

## 比較例 4 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬 E)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
デキストラン硫酸ナトリウム (分子量 50 万)	1.0 g/L
BSA	2.0 g/L

## 第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH 7.0)	10 mmol/L
4-アミノアンチピリン	0.3 g/L
ペルオキシダーゼ	20 kU/L
LPL6	0.05 kU/L
COO321	3.0 kU/L

【0077】

## 比較例 5 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬 F)

HEPES (pH 7.5)	10 mmol/L
EMSE	0.3 g/L
BSA	2.0 g/L

ナイミーン L207

0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

LPL6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

【0078】

## 比較例 6 HDL コレステロール測定用キット

以下の第一試薬および第二試薬からなる HDL コレステロール測定用キットを調製した。

## 第一試薬 (試薬 G)

HEPES (pH 7.5)

10 mmol/L

EMSE

0.3 g/L

デキストラン硫酸ナトリウム (分子量 50 万)

1.0 g/L

ナイミーン L207

0.07 g/L

## 第二試薬 (試薬 a)

HEPES (pH 7.0)

10 mmol/L

4-アミノアンチピリン

0.3 g/L

ペルオキシダーゼ

20 kU/L

LPL6

0.05 kU/L

COO321

3.0 kU/L

【0079】

## 実施例 5 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットを用いて、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

## (1) 検量線の作成

標準液として、生理食塩水 (HDL コレステロール濃度: 0.0 mg/dL) および血清 (HDL コレステロール濃度: 60.0 mg/dL) を、キットとし

て実施例 1 のキットを用いて、日立 7170 型自動分析装置により、HDL コレステロール濃度と「吸光度」との間の関係を示す検量線を作成した。

ここでの「吸光度」とは、以下の反応で測定された 2 つの吸光度 (E1 および E2) を基に、E2 から E1 を差し引くことにより得られた値を表す。

反応セルへ標準液 (3  $\mu$ L) と第一試薬 (0.24 mL) とを添加し 37℃ で 5 分間加温し、反応液の吸光度 (E1) を主波長 600 nm、副波長 700 nm で測定し、次いで、この反応液に第二試薬 (0.08 mL) を添加しさらに 37℃ で 5 分間加温し、反応液の吸光度 (E2) を主波長 600 nm、副波長 700 nm で測定した。

(2) ヒト血清検体と実施例 1 のキットとの反応による当該検体における「吸光度」の算出

(1) の検量線の作成において用いた標準液の代わりにヒト血清検体を用いる以外は、(1) の「吸光度」の算出方法と同様の方法により、当該検体における「吸光度」を算出した。

(3) ヒト血清検体中の HDL コレステロール濃度の測定

(2) で算出した「吸光度」と、(1) で作成した検量線とから、各検体中の HDL コレステロール濃度を測定した。

【0080】

実施例 6 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 2 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

実施例 7 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 3 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

実施例 8 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに実施例 4 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL

L コレステロールを測定した。

### 【0081】

#### 比較例 7 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 1 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 8 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 2 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 9 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 3 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 10 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 4 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 11 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 5 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 形自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

#### 比較例 12 HDL コレステロールの測定

実施例 1 のキットの代わりに比較例 6 のキットを用いる以外は実施例 5 の測定法と同様にして、日立 7170 型自動分析装置によりヒト血清 40 検体中の HDL コレステロールを測定した。

### 【0082】

次に、実施例 5～8 および比較例 7～12 の測定において用いたヒト血清 40 検体を用いて、クリニカルケミストリー第 45 巻、10 号（1999 年）に記載

されたDCM法 (Designated Comparison Method) により当該検体中のHDLコレステロールを測定し、各実施例および比較例での値と比較した。

実施例5～8および比較例7～12それぞれの測定法と、DCM法による測定法との相関係数を表1に示す。

【0083】

【表1】

測定法	測定キット		相関係数
	第一試薬	第二試薬	
実施例5	試薬A	試薬a	0.960
実施例6	試薬A	試薬b	0.958
実施例7	試薬A	試薬c	0.983
実施例8	試薬A	試薬d	0.996
比較例7	試薬B	試薬a	0.590
比較例8	試薬C	試薬a	0.385
比較例9	試薬D	試薬a	0.388
比較例10	試薬E	試薬a	0.800
比較例11	試薬F	試薬a	0.405
比較例12	試薬G	試薬a	0.118

【0084】

実施例5と、比較例7～12との比較から、コレステロール測定用酵素以外に、BSA、デキストラン硫酸ナトリウムおよびポリオキシエチレンアルキルアミンをすべて含有するキットを用いた測定においてのみ、DCM法による測定と良い相関係数が得られることが判明した。実施例5と実施例6との比較から、化学的に修飾されたコレステロールエステル加水分解酵素を用いた測定においても、DCM法による測定と良好な相関係数が得られることが判明した。また、実施例5と実施例7の比較、実施例6と実施例8との比較から、コレステロール測定用酵素、BSA、デキストラン硫酸ナトリウム、ポリオキシエチレンアルキルアミンの他に、胆汁酸類の1つであるコール酸ナトリウムを加えたキットを用いた測定においても、DCM法による測定と良い相関が認められた。

## 【0085】

実施例 9 M蛋白血症患者由来の血清中のHDLコレステロールの測定

検体としてM蛋白血症患者より得られた血清を用い、測定用キットとして実施例 1 のキットを用いて実施例 5 の測定法と同様にして日立 7170 型自動分析装置によりHDLコレステロールの測定を行った。

## 【0086】

比較例 13 M蛋白血症患者由来の血清中のHDLコレステロールの測定

検体としてM蛋白血症患者より得られた血清を用い、測定用キットとして比較例 5 のキットを用いて実施例 5 の測定法と同様にして日立 7170 型自動分析装置によりHDLコレステロールの測定を行った。その結果、表 2 に示すように比較例 5 の測定キットを用いた場合には、第二試薬が添加される前においても水不溶性の蛋白に起因する濁りが解消されていないが、デキストラン硫酸ナトリウムを含有する実施例 1 の測定キットを用いた場合には、第二試薬が添加される前には水不溶性の蛋白に起因する濁りが解消されていることが判明した。

## 【0087】

【表 2】

検体	第二試薬添加前（測光ポイント16）の吸光度（mAbs）	
	実施例 1 のキット	比較例 5 のキット
M蛋白血症検体 1	15.7	236.4
M蛋白血症検体 2	12.2	189.5
M蛋白血症検体 3	9.8	105.2
一般検体	6.2	6.1

## 【0088】

また、M蛋白血症患者検体を実施例 1 の測定キットで測定した値とDCM法の測定値の比較を表 3 に示す。表 3 に示した通り、実施例 1 のキットを用いた測定での測定値は、DCM法での測定値とほぼ一致し、本発明のキットを用いて、M



蛋白血症患者検体を正確に測定できることが明らかとなった。

【0089】

【表3】

検体	測定値 (mg/dL)	
	実施例9	比較例13 (DCM法)
M蛋白血症検体1	28.2	31.2
M蛋白血症検体2	15.5	16.0
M蛋白血症検体3	22.8	22.8
一般検体	66.2	68.8

【0090】

【発明の効果】

本発明により、簡便、かつ、M蛋白血症検体のような特殊な検体にも正確な測定ができるHDLコレステロールの測定方法、測定用試薬および測定用キットが提供される。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 通常の検体のみならず、M蛋白血症等の患者に由来する特殊な検体においても、簡便かつ正確に、高密度リポ蛋白中のコレステロールを測定するための方法、試薬およびキットを提供する。

【解決手段】 検体と、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール酸化酵素、または、コレステロールエステル加水分解酵素およびコレステロール脱水素酵素とを、非イオン性界面活性剤、ポリアニオンおよびアルブミンを含有する水性媒体中で反応させ、高密度リポ蛋白以外のリポ蛋白中のコレステロールを消去することなく、生成する過酸化水素または還元型補酵素を測定することを特徴とする、検体中の高密度リポ蛋白中のコレステロールの測定方法。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 0 1 3 2 7

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 1 6 2 4 7 8 ]

1. 変更年月日

1 9 9 4 年 9 月 1 3 日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区入船二丁目 1 番 1 号

氏 名

協和メデックス株式会社